

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-8-13-18

## ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА В СОСТАВЕ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА КРЫСЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

М. В. Осиков, Е. В. Симонян, О. Т. Саедгалина<sup>1</sup>

Исследовали влияние местного применения эритропоэтина (ЭПО) в составе трансдермальной пленки (ТДП) на изменения иммунного статуса при экспериментальной термической травме (ТТ) у крыс. ТТ IIIA степени площадью 3,5 % моделировали погружением межлопаточной области кожи в очищенную воду с температурой 98 – 99 °С. ЭПО в дозе 42 МЕ/см<sup>2</sup> в составе ТДП площадью 12 см<sup>2</sup> наносили ежедневно сразу после ТТ. Установлено, что при экспериментальной ТТ в крови снижается количество CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов на 5 сут на 30 % ( $p < 0,001$ ) и 60 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, на 8 сут на 60 % ( $p = 0,02$ ) и 62 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, и на 14 сут — на 17 % ( $p = 0,004$ ) и 70 % ( $p = 0,007$ ), соответственно; снижается концентрация IgG в сыворотке на 3, 5, 8 и 14 сут на 35 % ( $p = 0,003$ ), на 34 % ( $p = 0,009$ ), на 30 % ( $p = 0,009$ ) и на 31 % ( $p = 0,009$ ), соответственно. Изменения иммунного статуса при ТТ в том числе обусловлены увеличением концентрации в сыворотке ИЛ-1 $\beta$  и ИФН- $\gamma$  на 3 сут на 500 % ( $p < 0,001$ ) и 119 % ( $p = 0,001$ ), соответственно, на 5 сут — на 103 % ( $p = 0,02$ ) и 280 % ( $p = 0,02$ ), соответственно, на 8 сут — на 159 % ( $p < 0,001$ ) и 280 % ( $p = 0,001$ ), соответственно, и на 14 сут на 160 % ( $p = 0,002$ ) и на 185 % ( $p = 0,04$ ), соответственно; снижением концентрации ИЛ-4 на 3, 5 и 14 сут на 37 % ( $p = 0,001$ ), 23 % ( $p = 0,02$ ) и 18 % ( $p = 0,04$ ), соответственно, увеличением в крови количества лимфоцитов с признаками апоптоза и/или признаками некроза на 3 сут на 50,5 % ( $p = 0,004$ ) и 850 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, на 5 сут — на 108 % ( $p = 0,002$ ) и на 900 % ( $p = 0,003$ ), соответственно, и на 8 сут — на 172 % ( $p = 0,004$ ) и на 4000 % ( $p = 0,003$ ), соответственно. Площадь ожога при ТТ уменьшается на 5 и 8 сут на 30 % ( $p = 0,03$ ) и на 29 % ( $p = 0,01$ ), соответственно, а на 14 сут — на 45 % ( $p = 0,003$ ). Применение ЭПО в составе ТДП при ТТ сопровождается увеличением количества в крови CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> лимфоцитов на 5 сут на 28,5 % ( $p = 0,001$ ) и 55 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, на 8 сут — на 160 % ( $p = 0,01$ ) и 137 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, на 14 сут — на 8 и 250 % ( $p = 0,007$ ), соответственно, приводит к увеличению концентрации IgG в сыворотке на 3 и 14 сут эксперимента на 46 % ( $p = 0,0007$ ) и на 31 % ( $p = 0,016$ ), соответственно. Концентрация в сыворотке ИЛ-1 $\beta$  снижается на 3, 8 сут на 57 % ( $p = 0,01$ ) и 31 % ( $p = 0,038$ ), соответственно, ИФН- $\gamma$  — увеличивается на 3 сут на 245 % ( $p = 0,0002$ ) и снижается на 5 и 8 сут на 48 % ( $p = 0,03$ ) и 32 % ( $p = 0,04$ ), соответственно, а ИЛ-4 — увеличивается на 3 и 14 сут на 27 % ( $p = 0,02$ ) и 22 % ( $p = 0,018$ ), соответственно. Количество в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и/или признаками некроза в условиях применения ТДП с ЭПО снижается на 5 сут на 61,5 % ( $p = 0,01$ ) и 50 %, соответственно, на 8 сут — на 4,7 % и на 65 % ( $p = 0,003$ ), на 14 сут — на 92 % ( $p = 0,016$ ) и на 50 % ( $p = 0,02$ ), соответственно. Площадь ожога в условиях применения ТДП с ЭПО уменьшается на 5 и 8 сут в среднем на 45 % ( $p = 0,025$ ), на 42 % ( $p = 0,01$ ), соответственно, а на 14 сут — на 78 % ( $p = 0,001$ ).

**Ключевые слова:** термическая травма; эритропоэтин; трансдермальные пленки; иммунный статус; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Количество людей, пострадавших от ожогов, не имеет тенденции к снижению, среди них 50 % случаев

приходится на термическую травму (ТТ), остальные 50 % — на химические, электроожоги, ожоги трением и излучением. Основной проблемой в лечении ТТ является развитие как системных (вторичный иммунодефицит, сепсис, септический шок, полиорганная недостаточность), так и местных осложнений (инфици-

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Россия, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.

рование раневой поверхности, образование патологических рубцов, нарушение двигательных функций), патогенез которых связан, в том числе, с изменениями клеточного и гуморального звеньев иммунитета [15]. В связи с этим лекарственное воздействие при ТТ должно включать как системные, так и местные иммунокорректирующие подходы. В настоящее время применение раневых покрытий является одним из методов консервативного лечения ожоговых ран, их преимуществом является создание и поддержание влажной среды в ране, которая способствует дифференцировке клеток, эффективному межклеточному взаимодействию, и как следствие, сокращению сроков заживления [1]. В состав пленочных покрытий могут входить различные группы фармакологически активных веществ (противомикробные средства, антисептические средства, анальгетики и др.). Интерес вызывают эндогенные вещества, обладающие иммуномоделирующим действием. Ранее нами продемонстрированы плейотропные, в том числе иммунотропные эффекты эритропозтина (ЭПО) в клинических и в экспериментальных условиях при различной патологии [4]. Существуют данные об успешном системном применении ЭПО при ТТ [14]. Сведения о локальном применении ЭПО в составе трансдермальных пленок при ТТ в доступной литературе отсутствуют. Цель работы — исследование влияния трансдермальной пленки с эритропозтином на иммунный статус при экспериментальной ТТ у крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 90 белых нелинейных половозрелых крысах массой  $(240 \pm 20)$  г (Экспериментально-биологическая клиника (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск) при строгом соблюдении общепринятых рекомендаций по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 ( $n = 10$ ) — интактный контроль; группа 2 ( $n = 40$ ) — ТТ с наложением на область ожога асептической повязки (производство — Аптека при клинике ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России) (группа ТТ); группа 3 ( $n = 40$ ) — ТТ с наложением на область ожога трансдермальной пленки (ТДП) с ЭПО (группа ТТ + ЭПО). Пленку в группе 3 наносили сразу после ТТ, закрепляя асептической повязкой. Перевязку животных в обеих опытных группах осуществляли ежедневно. Моделирование ТТ IIIA степени площадью 3,5 % осуществляли погружением участка межлопаточной области кожи животного, находящегося под общей анестезией (Золетил, VirbacSanteAnimale, Франция), в горячую очищенную воду с температурой  $98 - 99$  °C на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами при окраске препаратов кожи гематоксилином и эозином. Через 24 ч после ТТ проводили иссечение некротизированных участков

раны [8]. В предварительных исследованиях был разработан состав ТДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы, в который включали с концентрацией  $42 \text{ ME/cm}^2$  ЭПО (Эпокрин, ФГУП “Гос. НИИ ОЧБ” ФМБА, Россия; фармацевтическая база — кафедра Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России), и проведена ее оценка в соответствии с фармакотехнологическими параметрами: органолептические показатели (внешний вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие посторонних примесей и микротрещин под микроскопом), адгезивная способность, механическая прочность на разрыв, толщина [5]. Иммунологические и морфологические исследования проводили на 3, 5, 8 и 14 сут ТТ в соответствии с фазами раневого процесса по М. И. Кузину [2]. Забор крови осуществлялся под общим наркозом после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка. Определение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов крови проводили с помощью проточного цитофлуориметра “Navios” (BeckmanCoulter, США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител “eBioscience” (США) с фенотипом  $\text{CD3}^+$  и  $\text{CD45RA}^+$ , которые являются маркерами преимущественно Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов соответственно [13]. Гибель лимфоцитов, выделенных из крови, оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора “Annexin 5-FITC/7-AADkit” (BeckmanCoulter, США) на проточном цитофлуориметре “Navios” (BeckmanCoulter, США). Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротические клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), клетки с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). Результат выражали в % от общего количества лимфоцитов. Определение концентрации в сыворотке ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, иммуноглобулина (Ig) G, IgM проводили с помощью иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе “PersonalLAB” (Италия) с применением специфических крысиных тест-систем фирмы ALPCO (США) и BenderMedsystems (Австрия). Результат выражали в пг/мл для цитокинов, в нг/мл — для IgM и IgG. Динамику заживления ожоговой раны оценивали с помощью цифровой планиметрии с использованием цифровой фотокамеры “Nikon Coolpix S2800”. С помощью стандартного пакета программы Microsoft Office Visio совмещали стандартную линейку с линейкой на снимке, отмечали область повреждения и автоматически рассчитывали ее площадь [10]. Результаты обрабатывали с использованием программы “Statistica 10.0 for Windows”. Характеристика выборки представлена в формате Me ( $Q_{25} - Q_{75}$ ), где Me — медиана,  $Q_{25}$  и  $Q_{75}$  — 25-й и 75-й квартиль, соответственно. Для

оценки значимости различий между группами применяли критерии Манна — Уитни, Вальда — Вольфовитца, Краскела — Уоллиса. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки изменений адаптивного иммунитета при ТТ исследовали популяционный спектр лимфоцитов в крови и содержание иммуноглобулинов в сыворотке. Установлено, что на 3 сут ТТ абсолютное содержание CD3<sup>+</sup>- и CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов статистически значимо не изменяется (таблица). На 5, 8 и 14 сут ТТ количество CD3<sup>+</sup>- и CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов снижается относительно показателей интактных животных. При оценке содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в динамике заживления ТТ отмечается их снижение на 8 сут, по сравнению с 3 и 5 сут ТТ. На 14 сут количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов снижено относительно 3 сут, но по сравнению с 5 и 8 сут ТТ их содержание увеличивается. Таким образом, наибольшее снижение CD3<sup>+</sup>-лим-

фоцитов в крови при ТТ наблюдается на 8 сут, к 14 сут начинается восстановление содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови. Количество CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов в динамике развития ТТ снижается на 5 и 8 сут, по сравнению с 3 сут эксперимента; на 14 сут — относительно 5 сут. В отличие от динамики количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов содержание CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови при ТТ остается сниженным на всех сроках наблюдения.

По-видимому, ведущим механизмом снижения количества лимфоцитов в крови при ТТ выступает усиление их гибели в крови за счет апоптоза и/или некроза. Установлено, что при ТТ количество в крови Annexin-5-FITC+/7-AAD- лимфоцитов и Annexin-5-FITC+/7-AAD+ лимфоцитов, то есть соответственно лимфоцитов с ранними и поздними признаками апоптоза, признаками некроза на 3, 5 и 8 сут увеличивается, а на 14 сут статистически значимо не отличается от группы интактных животных (таблица). При оценке динамики содержания в крови клеток с ранними при-

Влияние эритропоэтина в дозе 42 МЕ/см<sup>2</sup> в составе трансдермальной пленки на показатели иммунного статуса крыс при экспериментальной ТТ (Ме (Q<sub>25</sub> – Q<sub>75</sub>))

Показатель	Группа								
	Интактные (n = 10)	ТТ 3 сут (n = 10)	ТТ + ЭПО 3 сут (n = 10)	ТТ 5 сут (n = 10)	ТТ + ЭПО 5 сут (n = 10)	ТТ 8 сут (n = 10)	ТТ + ЭПО 8 сут (n = 10)	ТТ 14 сут (n = 10)	ТТ + ЭПО 14 сут (n = 10)
CD3 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	3,00 (2,80 – 3,40)	3,20 (2,10 – 3,80)	3,70 (2,90 – 3,80)	2,10 (2,10 – 2,20)*	2,70 (2,50 – 3,10) <sup>S##</sup>	1,20 (0,90 – 1,30) <sup>#S</sup>	3,20 (3,00 – 3,30) <sup>&amp;SS</sup>	2,50 (2,40 – 2,60) <sup>*S&amp;</sup>	2,70(2,40 – 3,10)
CD45RA <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	2,10 (2,00 – 2,20)	1,80 (0,70 – 2,20)	2,20 (1,90 – 2,30)	0,90 (0,70 – 1,20) <sup>#</sup>	1,40 (1,30 – 1,50) <sup>S##</sup>	0,80 (0,80 – 1,10) <sup>#</sup>	1,90 (1,40 – 1,90) <sup>&amp;</sup>	0,60 (0,50 – 2,10) <sup>*S</sup>	2,15 (1,80 – 2,60) <sup>@SS</sup>
Ig M, нг/мл	32,08 (21,96 – 64,12)	32,08 (21,96 – 64,12)	43,23 (22,88 – 53,93)	40,98 (34,34 – 47,34)	39,82 (31,25 – 53,65)	47,23 (43,91 – 65,88)	48,44 (33,88 – 76,75)	53,47 (53,47 – 84,42) <sup>S</sup>	57,06 (36,50 – 99,84) <sup>##SS&amp;&amp;</sup>
Ig G, нг/мл	162,15 (134,25 – 199,21)	104,97 (104,42 – 111,88)*	152,76 (142,82 – 157,46) <sup>#</sup>	107,74 (85,71 – 137,02)*	99,16 (43,00 – 149,17) <sup>##</sup>	10 <sup>9</sup> ,40 (89,29 – 128,18)*	94,98 (89,98 – 123,62)	111,05 (92,86 – 119,34)*	146,96 (143,65 – 148,07) <sup>@SS</sup>
ИЛ-1β, пг/мл	31,30 (31,30 – 31,30)	194,01 (70,52 – 398,84)*	82,41 (43,82 – 148,61) <sup>#</sup>	63,59 (39,65 – 138,89)*	60,67 (40,17 – 84,39)	80,43 (76,47 – 195,83)*	55,30 (22,95 – 126,39) <sup>&amp;</sup>	83,50 (50,85 – 98,75) <sup>*S</sup>	92,31 (76,47 – 115,10) <sup>SS&amp;&amp;</sup>
ИФН-γ, пг/мл	15,60 (5,25 – 15,60)	32,95 (18,12 – 41,18)*	114,15 (81,59 – 218,75) <sup>#</sup>	59,31 (31,30 – 395,45) <sup>#</sup>	30,48 (28,01 – 48,31) <sup>S##</sup>	56,01 (46,13 – 84,30) <sup>#</sup>	37,89 (32,95 – 57,66) <sup>&amp;##</sup>	44,48 (25,53 – 83,96)*	46,13 (42,83 – 56,01) <sup>##</sup>
ИЛ-4, пг/мл	5,66 (5,61 – 5,74)	3,56 (3,10 – 5,24)*	4,52 (4,16 – 5,48) <sup>#</sup>	4,34 (3,01 – 5,36)*	4,52 (3,80 – 4,64)	5,24 (3,28 – 5,83)	5,00 (4,64 – 5,96) <sup>##</sup>	3,80 (3,56 – 6,62) <sup>*&amp;</sup>	4,64 (4,52 – 5,36) <sup>@</sup>
Annexin-5- FITC-/7-A AD-, %	91,90 (81,80 – 93,10)	90,20 (84,00 – 93,90)	86,40 (85,10 – 87,05)	82,10 (80,00 – 84,80)*	89,15 (81,50 – 92,35) <sup>S</sup>	75,15 (69,15 – 79,65) <sup>*S</sup>	75,80 (73,60 – 83,70) <sup>##</sup>	93,45 (89,35 – 96,90) <sup>S&amp;</sup>	99,30 (99,20 – 99,40) <sup>@##SS&amp;&amp;</sup>
Annexin-5- FITC+/7-A AD-, %	7,85 (7,25 – 8,35)	11,90 (7,30 – 17,65)*	12,45 (11,10 – 14,00)	16,40 (14,70 – 18,80)*	6,30 (4,90 – 13,90) <sup>S##</sup>	21,40 (19,00 – 26,90) <sup>*S</sup>	22,60 (15,55 – 24,25) <sup>##SS</sup>	8,10 (4,20 – 11,40) <sup>S&amp;</sup>	0,60 (0,35 – 0,70) <sup>@##SS&amp;&amp;</sup>
Annexin- 5-FITC+/7 -AAD+, %	0,10 (0,10 – 0,30)	0,95 (0,55 – 1,40)*	0,95 (0,75 – 1,50)	1,00 (1,00 – 1,00)*	1,50 (0,00 – 2,20) <sup>##</sup>	4,65 (2,50 – 7,40) <sup>*S</sup>	1,60 (0,75 – 2,15) <sup>S&amp;</sup>	0,10 (0,10 – 0,40) <sup>#S&amp;</sup>	0,05 (0,00 – 0,10) <sup>@##SS&amp;&amp;</sup>

\* Значимые ( $p < 0,05$ ) различия с группой интактных животных, # — с группой ТТ на 3 сут, S — с группой ТТ на 5 сут, & — с группой ТТ на 8 сут, @ — с группой ТТ на 14 сут; ## — с группой ТТ + ЭПО на 3 сут, SS — с группой ТТ + ЭПО на 5 сут, && — с группой ТТ + ЭПО на 8 сут.

знаками апоптоза, признаками позднего апоптоза и некроза при ТТ отмечается увеличение содержания всех типов клеток на 8 сут относительно 3 и 5 сут ТТ, а на 14 сут наблюдается снижение по сравнению с 3, 5 и 8 сут ТТ. Количество интактных лимфоцитов (Annexin-5-FITC-/7-AAD-) снижается на 5 и 8 сут ТТ и статистически значимо не изменяется на 3 и 14 сут эксперимента, в динамике ТТ их количество снижается на 8 сут относительно 3 и 5 сут наблюдений и увеличивается на 14 сут, по сравнению с 5 и 8 сут ТТ.

Снижение при ТТ содержания в крови  $CD3^+$ - и  $CD45RA^+$ -лимфоцитов может быть обусловлено, во-первых, гибелью лимфоцитов в кровотоке за счет апоптоза и/или некроза под влиянием ФНО- $\alpha$  и других проапоптогенных цитокинов и медиаторов воспаления, активных форм кислорода; во-вторых, угнетением лимфоцитопозеза в условиях эндогенной интоксикации, гипоксии смешанного генеза при ТТ; и, в-третьих, перераспределением лимфоцитов между периферической кровью и очагом повреждения. Снижение содержания лимфоцитов в крови при ТТ отмечают и другие авторы [3].

В условиях применения ТДП с ЭПО при ТТ количество  $CD45RA^+$ - и  $CD3^+$ -лимфоцитов в крови статистически значимо не изменяется относительно группы крыс с ТТ на 3 сут, а на 5, 8 и 14 сут эксперимента — увеличивается (таблица). При оценке динамики количества  $CD3^+$ -лимфоцитов при ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО на 5 сут отмечается их снижение относительно 3 сут, а на 8 сут количество  $CD3^+$ -лимфоцитов увеличивается по сравнению с 5 сут ТТ. В динамике ТТ при использовании ТДП с ЭПО количество  $CD45RA^+$ -лимфоцитов снижается на 5 сут по сравнению с 3 сут.

При применении ТДП с ЭПО при ТТ количество клеток с ранними признаками апоптоза статистически значимо не изменяется на 3 и 8 сут и снижается на 5 и 14 сут эксперимента относительно группы крыс с ТТ. В динамике течения ТТ на 5 сут количество клеток с ранними признаками апоптоза снижается, по сравнению с 3 сут наблюдений; на 8 сут — увеличивается относительно 3 и 5 сут и на 14 сут вновь снижается, по сравнению с 3, 5 и 8 сут. В условиях применения при ТТ ЭПО в составе ТДП количество в крови лимфоцитов с поздними признаками апоптоза и/или признаками некроза статистически значимо не изменяется на 3 и 5 сут, снижается на 8 и 14 сут эксперимента. При оценке динамики содержания клеток с поздними признаками апоптоза, признаками некроза отмечается увеличение их содержания на 5 сут относительно 3 сут эксперимента, снижение на 8 сут по сравнению с 5 сут; и снижение на 14 сут относительно 3, 5 и 8 сут. Количество в крови интактных лимфоцитов статистически значимо не изменяется относительно группы с ТТ на 3 и 8 сут применения ТДП с ЭПО при ТТ и увеличивается на 5 и 14 сут.

При оценке содержания иммуноглобулинов в сыворотке при ТТ зафиксировано, по сравнению с группой интактных животных, снижение при ТТ концентрации IgG в сыворотке во все сроки эксперимента, содержание IgM в сыворотке статистически значимо не изменяется во все сроки наблюдения. По данным литературы, концентрация иммуноглобулинов в крови при ТТ может снижаться только в ранние сроки ТТ или на протяжении 30 сут после термического поражения [6]. Принято считать, что выраженность лимфоцитопении, снижение концентрации иммуноглобулинов в крови зависят от глубины и площади ожогового повреждения, а также от стадии раневого процесса.

При применении ТДП с ЭПО при ТТ содержание IgM в сыворотке статистически значимо не изменяется на 3, 5, 8 и 14 сут наблюдений (таблица). Содержание IgG в сыворотке увеличивается на 3 и 14 сут ТТ и статистически значимо не изменяется на 5 и 8 сут ТТ. При оценке динамики содержания IgG в сыворотке в условиях применения ТДП с ЭПО при ТТ установлено, что концентрация его снижается на 5 сут по сравнению с 3 сут эксперимента и увеличивается на 14 сут относительно 5 сут.

Очевидно, что изменение концентрации цитокинов в крови при ТТ вносит определенный вклад в формирование иммунного статуса при ТТ. При экспериментальной ТТ наблюдается увеличение содержания в сыворотке ИЛ-1 $\beta$  и ИФН- $\gamma$  на 3, 5, 8 и 14 сут эксперимента (таблица). При оценке концентрации ИЛ-1 $\beta$  в динамике ТТ установлено, что на 14 сут ТТ его содержание увеличивается, по сравнению с 5 сут. При оценке концентрации ИФН- $\gamma$  в динамике ТТ установлено, что на 5 и 8 сут концентрация ИФН- $\gamma$  увеличивается по сравнению с 3 сут ТТ. Концентрация ИЛ-4 снижается на 3, 5 и 14 сут ТТ, на 8 сут — статистически значимо не изменяется по сравнению с группой интактных животных. В динамике ТТ на 14 сут наблюдается снижение концентрации ИЛ-4, по сравнению с 8 сут ТТ.

Как известно, ИЛ-1 $\beta$  продуцируется моноцитами/макрофагами и обладает способностью активировать нейтрофилы, в том числе их цитотоксическое действие, стимулировать проницаемость сосудистой стенки и другими эффектами. ИФН- $\gamma$  секретируется преимущественно Т-лимфоцитами, активирует макрофаги, нейтрофилы, НК-клетки, стимулирует дифференцировку Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. ИЛ-4 продуцируется, главным образом Th2, стимулирует выработку антител В-лимфоцитами, подавляет генерацию цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток, обладает противовоспалительными свойствами. Снижение концентрации ИЛ-4 в крови ограничивает пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов.

При ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО наблюдается снижение концентрации в сыворотке ИЛ-1 $\beta$  на 3 и 8 сут, на 5 и на 14 сут ТТ его концентрация статистически значимо не отличается от группы сравнения.

В динамике ТТ при местном применении ЭПО в составе ТДП содержание ИЛ-1 $\beta$  увеличивается на 14 сут относительно 5 и 8 сут. Содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке при ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО увеличивается на 3 сут и снижается на 5 и 8 сут эксперимента, на 14 сут концентрация ИФН- $\gamma$  статистически значимо не изменяется относительно группы с ТТ. В динамике ТТ при применении ТДП с ЭПО на 5, 8 и 14 сут содержание ИФН- $\gamma$  снижается относительно 3 сут. Содержание ИЛ-4 в сыворотке увеличивается на 3 и 14 сут ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО и статистически значимо не изменяется на 5 и 8 сутки. В динамике течения ТТ концентрация ИЛ-4 на 8 сут увеличивается, по сравнению с 3 сут.

Необходимо отметить, что площадь ожога статистически значимо не изменяется на 3 сут, уменьшается на 5 и 8 сут наблюдений на 30 % ( $p = 0,03$ ) и на 29 % ( $p = 0,01$ ), соответственно, а на 14 сут — на 47,25 % ( $p = 0,003$ ), по сравнению с исходной площадью повреждения (3,32 (3,10 – 3,65) (%)). В динамике заживления ТТ площадь ожога уменьшается на 5 сут на 18,5 % ( $p = 0,024$ ), по сравнению с группой животных с ТТ на 3 сут наблюдений и на 14 сут на 71,5 % ( $p = 0,002$ ) относительно 8 сут ТТ. В условиях применения ТДП с ЭПО площадь ожога уменьшается на 5 и 8 сут ТТ на 45 % ( $p = 0,025$ ) и 42 % ( $p = 0,01$ ), соответственно, на 14 сут наблюдений — в среднем на 78 % ( $p = 0,001$ ) относительно исходной площади ожога. В динамике заживления ожогового повреждения в условиях применения ТДП с ЭПО площадь ТТ уменьшается на 5 сут на 21,9 % ( $p = 0,03$ ) относительно 3 сут наблюдений, на 8 сут на 13 % ( $p = 0,001$ ), по сравнению с 5 сут, и на 14 сут на 64,5 % ( $p = 0,012$ ) относительно 8 сут после применения ТДП с ЭПО.

Современные представления о механизмах действия ЭПО позволяют отнести его одновременно к гормонам, факторам роста и цитокинам. Открытие рецепторов ЭПО на эндотелиоцитах, моноцитах/макрофагах, лимфоцитах позволяет предположить прямые иммуотропные эффекты ЭПО при ТТ [11]. Показано, что экспрессия гена рецептора ЭПО и количество рецепторов для ЭПО на лимфоцитах изменяется в зависимости от активности клетки и определяется транскрипционным фактором Sp1 [12]. Так, стимуляции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов антителами приводит к увеличению числа рецепторов для ЭПО с 100 до 1000 молекул на клетку. Накопленные сведения позволяют рассматривать систему ЭПО-рецептор ЭПО на ауто- и паракринном уровне как звено неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы ЭПО на неэритроидных клетках обозначаются как защищающие ткань рецепторы (TPR).

По-видимому, пусковыми факторами в механизме действия ЭПО в составе ТДП при ТТ являются его антиоксидантные, антиапоптогенные, рост клетостимулирующие эффекты. ЭПО обладает антиоксидантным

эффектом, реализуемым через активацию генов гемоксигеназы-1, аквапорина-1 и др. [8]. Внутриклеточная трансдукция сигнала после связывания ЭПО с рецептором обеспечивается Jak-2-зависимыми сигнальными путями STAT-5 приводит к активации транскрипции антиапоптогенных генов и генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток, фосфатидилинозитол-3-киназа, протеинкиназа В и митоген-активируемая протеинкиназа подавляют активность киназы гликогенсинтазы-3 $\beta$ , что приводит к стабилизации мембраны митохондрий (сохранение  $\Delta\psi$  митохондриальной мембраны), снижению выхода цитохрома С и Аraf-1-зависимой активации каспаз. Кроме того, снижение активности киназы гликогенсинтазы-3 $\beta$  угнетает NF $\kappa$ B-зависимый синтез провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ6, ФНО- $\alpha$ , MCP-1 и др. ЭПО может блокировать в условиях *in vitro* продукцию лейкоцитами ряда цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и др. [7]. Как следствие, в очаге ТТ снижаются площадь вторичной альтерации, активация клеток-продуцентов медиаторов воспаления, в том числе провоспалительных цитокинов. В частности, нами показано снижение концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$  в крови. Снижение выхода из очага повреждения и снижение концентрации в крови провоспалительных аутокоидов, а также системное действие ЭПО, диффундирующего из ТДП в очаг повреждения, а затем в кровь, ограничивают гибель за счет некроза и апоптоза лимфоцитов в периферической крови. По нашим данным, применение ЭПО в составе ТДП при ТТ приводит к снижению количества в крови лимфоцитов с признаками раннего и позднего апоптоза, признаками некроза и, как следствие, к увеличению количества интактных лимфоцитов. Отсутствие при этом значимых изменений содержания лимфоцитов в крови может быть связано с выходом лимфоцитов в очаг термического повреждения, их участием в реакциях завершающей стадии воспалительного процесса и ускорением репарации поврежденных тканей. Отражением иммуотропных эффектов ЭПО в составе ТДП является ускорение заживления ожоговой раны, уменьшение площади ожога в динамике ТТ.

## ВЫВОДЫ

1. При экспериментальной ТТ кожи в крови крыс снижается количество CD3<sup>+</sup>- и CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов на 5 – 14 сут на 30 – 70 % ( $p < 0,001$ ); снижается концентрация IgG в сыворотке в среднем на 30 % ( $p < 0,005$ ); увеличивается концентрация в сыворотке ИЛ-1 $\beta$  и ИФН- $\gamma$  на 160 – 500 % ( $p < 0,001$ ); снижается концентрация ИЛ-4 на 37 – 18 % ( $p = 0,04$ ); увеличивается количество лимфоцитов с признаками апоптоза и/или признаками некроза на 50 – 4000 % ( $p = 0,003$ ). Площадь ожога при ТТ уменьшается на 5 и 8 сут на 30 % ( $p = 0,03$ ) и на 29 % ( $p = 0,01$ ), соответственно, а на 14 сут — на 45 % ( $p = 0,003$ ).

2. Эритропоэтин (Эпокрин, ФГУП “Гос. НИИ ОЧБ” ФМБА, Россия) в дозе 42 МЕ/см<sup>2</sup> в составе ТДП площадью 12 см<sup>2</sup> у крыс с моделью ТТ кожи IIIA степени площадью 3,5 % приводит к коррекции параметров клеточного и гуморального иммунитета. Количество в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и/или признаками некроза в условиях применения трансдермальной пленки с эритропоэтином снижается на 61 – 92 % ( $p = 0,01$ ), площадь ожога уменьшается в среднем на 45 – 78 % ( $p = 0,001$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Н. Карякин, И. А. Клеменова, *Межд. ж. приклад. и фундам. исслед.*, № 9, 495 – 499 (2015).
2. М. И. Кузин, Б. М. Костюченко, *Ритол Классик*, 592 (1990).
3. М. В. Осиков, А. Г. Лихачева, Л. Ф. Телешева, *Фундам. исслед.*, № 8, 381 – 386 (2012).
4. М. В. Осиков, Т. А. Григорьев, А. А. Федосов, *Фундам. исслед.*, № 10, 285 – 289 (2012).
5. М. В. Осиков, Е. В. Симонян, О. Т. Саедгалина, Патент РФ 2611401, *Бюл. изобрет.*, № 6 (2017).
6. L. M. Bariar, A. Bal, A. Hasan, V. Sharma, *J. Indian Med. Assoc.*, **94**(4), 133 (1996).
7. H. E. Broxmeyer, *J. Exp. Med.*, **210**(2), 205 – 208 (2013).
8. J. Dang, R. Jia, Y. Tu, *Biomed. Pharmacother.*, **64**(10), 681 – 685 (2010).
9. V. S. Fear, W. P. Poh, S. Valvis, *Burns*, **42**(4), 815 – 824 (2016).
10. A. Joseph, W. K. Lew, D. A. Rapp, et al., *Published January*, **12**, 19 – 26 (2009).
11. K. A. Lisowska, A. Debska-Slizieñ, E. Bryl, et al., *Artif. Organs*, **34**(8), 654 – 662 (2010).
12. K. Maiese, Z. Z. Chong, F. Li, Y. C. Shang, *Prog. Neurobiol.*, **85**(2), 194 – 213 (2008).
13. G. E. Ringheim, L. Lee, L. Laws-Ricker, et al., *Front. Neurol.*, **169**(4), 1 – 12 (2013).
14. A. Sandhi, A. Wardhana, *J. Plastik Rekonstruksi*, **3**(1), 1 – 8 (2016).
15. A. Shalom, E. Kramer, M. Westreich, *Ann. Plasturg.*, **66**(6), 607 – 609 (2011).

Поступила 13.03.18

## THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN IN TRANSDERMAL FILM COMPOSITION ON IMMUNE STATUS INDICES OF RATS WITH EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

M. V. Osikov, E. V. Simonyan, and O. T. Saedgalina

Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, ul. Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092 Russia

The influence of local application of erythropoietin (EPO) in a transdermal film (TDF) composition on the immune status changes was investigated in rats with experimental thermal injury (TI). TI IIIA degree with 3.5% area of damage was modeled by immersion of the interscapular area of the skin in purified water at a temperature of 98 – 99°C. EPO at a dose of 42 IU/cm<sup>2</sup> in TDF with an area of 12 cm<sup>2</sup> was applied daily immediately after TI. It was found that the experimental TI decreases the amount of CD3<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes in the blood on the 5th day by 30% ( $p < 0.001$ ) and 60% ( $p < 0.001$ ), respectively; on the 8th day by 60% ( $p = 0.02$ ) and 62% ( $p < 0.001$ ), respectively; and on the 14th day by 17% ( $p = 0.004$ ) and 70% ( $p = 0.007$ ), respectively; and decreases the concentration of IgG in serum on the 3rd, 5th, 8th, and 14th days by 35% ( $p = 0.003$ ), 34% ( $p = 0.009$ ), 30% ( $p = 0.009$ ), and 31% ( $p = 0.009$ ), respectively. These TI-induced changes in the immune status were related to increase in the concentration of serum IL-1d and IFN-g on the 3rd day by 500% ( $p < 0.001$ ) and 119% ( $p = 0.001$ ), respectively; on the 5th day by 103% ( $p = 0.02$ ) and 280% ( $p = 0.02$ ), respectively; on the 8th day by 159% ( $p < 0.001$ ) and 280% ( $p = 0.001$ ), respectively; and on the 14th day by 160% ( $p = 0.002$ ) and 185% ( $p = 0.04$ ) respectively; decrease in the concentration of IL-4 on the 3, 5, and 14th days by 37% ( $p = 0.001$ ), 23% ( $p = 0.02$ ), and 18% ( $p = 0.04$ ), respectively; and an increase in the blood number of lymphocytes with signs of apoptosis and/or necrosis on the 3rd day by 50.5% ( $p = 0.004$ ) and 850% ( $p < 0.001$ ), respectively, on the 5th day by 108% ( $p = 0.002$ ) and 900% ( $p = 0.003$ ), respectively, and on the 8th day by 172% ( $p = 0.004$ ) and 4000% ( $p = 0.003$ ), respectively. The burn area at TI decreases on the 5th and 8th days by 30% ( $p = 0.03$ ) and 29% ( $p = 0.01$ ), respectively, and on the 14th day by 45% ( $p = 0.003$ ). The use of EPO in the TDF composition at TI is accompanied by an increase in the amount of CD45RA<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> lymphocytes in the blood on the 5th day by 28.5% ( $p = 0.001$ ) and 55% ( $p < 0.001$ ), respectively; on the 8th day by 160% ( $p = 0.01$ ) and 137% ( $p < 0.001$ ) respectively; at the 14th day by 8 and 250% ( $p = 0.007$ ), respectively; and leads to increase in the concentration of IgG in serum on the 3rd and 14th days of the experiment by 46% ( $p = 0.0007$ ) and 3% ( $p = 0.016$ ), respectively. Serum concentration of IL-1b decreases on the 3rd and 8th days by 57% ( $p = 0.01$ ) and 31% ( $p = 0.038$ ), respectively; IFN-g increases on the 3rd day by 245% ( $p = 0.0002$ ) and decreases on the 5th and 8th days by 48% ( $p = 0.03$ ) and 32% ( $p = 0.04$ ), respectively; and IL-4 increases on the 3rd and 14th days by 27% ( $p = 0.02$ ) and 22% ( $p = 0.018$ ), respectively. The number of lymphocytes in the blood with signs of apoptosis and/or signs of necrosis in the presence of TDF with EPO decreases on the 5th day by 61.5% ( $p = 0.01$ ) and 50%, respectively; on the 8th day by 4.7 and 65% ( $p = 0.003$ ), and on the 14th day by 92% ( $p = 0.016$ ) and 50% ( $p = 0.02$ ), respectively. The area of burn in terms of TDF with EPO decreases on the 5th and 8th days on the average by 45% ( $p = 0.025$ ) and 42% ( $p = 0.01$ ), respectively; and on the 14th day by 78% ( $p = 0.001$ ).

**Keywords:** thermal injury; erythropoietin; transdermal film; immune status; rats.